

**Carrier-fixed proteases and their use in biotechnology.**

Patent Number: EP0080077  
Publication date: 1983-06-01  
Inventor(s): BURGER ERICH DR; HARTMEIER WINFRIED PROF DR  
Applicant(s): BOEHRINGER INGELHEIM KG (DE)  
Requested Patent: ☐ EP0080077, A3, B1  
Application Number: EP19820110043 19821030  
Priority Number(s): DE19813145684 19811119  
IPC Classification: C12N11/02; C12H1/00; A23L2/34  
EC Classification: C12H1/00B, C12N11/02, A23L2/84  
Equivalents: AU9075682, CA1202584, ☐ DE3145684, ZA8208483  
Cited Documents: DE1915970; US3597219

**Abstract**

1. Process for the preparation of proteases fixed on a carrier of gel-forming proteins, characterised in that the proteases are mixed with a gel-forming protein, the mixture is treated with an organic solvent having an enzyme-precipitating activity and subsequently the particle suspension formed is reacted with one or more cross-linking agents.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 080 077**  
**A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 82110043.5

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: **C 12 N 11/02, C 12 H 1/00,**  
**A 23 L 2/34**

(22) Anmeldetag: 30.10.82

(30) Priorität: 19.11.81 DE 3145684

(71) Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM KG, ZA Patente,**  
**D-6507 Ingelheim am Rhein (DE)**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung: 01.06.83  
Patentblatt 83/22

(84) Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU**  
**NL SE**

(72) Erfinder: **Bürger, Erich, Dr., Leipzigstrasse 7a,**  
**D-6530 Bingen (DE)**  
Erfinder: **Hartmeyer, Winfried, Prof. Dr., Melatener**  
**Strasse 145a, D-5100 Aachen (DE)**

(54) **Trägerfixierte Proteasen und ihre Anwendung in der Biotechnologie.**

(57) **An ungehärteten gelbildenden Proteinen mittels kova-**  
**lenter Vernetzung fixierte Proteasen und ihre Anwendung**  
**zur Beseitigung des Eiweißtrubs in Getränken wie Wein,**  
**Bier oder Fruchtsäften.**

**EP 0 080 077 A2**

Die Erfindung betrifft auf neuartige Weise kovalent an ein Trägerprotein fixierte Proteasen, ihre Herstellung und ihre Anwendung in der Biotechnologie.

Proteasen haben erhebliche Bedeutung in der Getränkeindustrie, da bei vielen klaren Getränken (wie Wein, Bier und Fruchtsäfte) in der Wärme oder auch beim Abkühlen Eiweißtrübungen auftreten können.

Diesem Problem wird z.T. bis heute durch Bentonit-Behandlung begegnet. Hierdurch wird zwar die erforderliche Stabilität erreicht, jedoch tritt gleichzeitig eine Reihe gravierender Nachteile auf. So wird durch die starke Adsorptionswirkung auch eine Reihe wertvoller Substanzen, wie Aroma-, Bukett- und/oder Farbstoffe entfernt, ferner können unerwünschte Metallionen eingetragen werden, und drittens ergeben sich erhebliche Mengen an Trub, dessen Aufarbeitung einigen Aufwand erfordert.

Es wurde daher bereits vorgeschlagen, die den Wärme- bzw. Kälte trub bildenden Proteine durch Proteasen aufzulösen (s.Z. für Lebensmitteluntersuchung und -forschung 134 (1967), S. 87-97).

Jedoch ergeben sich auch bei dieser Methode Nachteile. Zunächst sind die Kosten für die Enzymanreicherung und -isolierung recht hoch, da die Enzyme nicht stabil sind und auch nicht rückgewonnen werden können. Ferner ist das Verbleiben von löslichen Enzymen im Getränk lebensmittelrechtlich bedenklich oder sogar unzulässig.

Zur Lösung dieser Probleme bietet sich an, die verwendeten Enzyme unlöslich zu machen, indem man sie an

wasserunlösliche Trägerstoffe fixiert. Dies erlaubt, die Enzyme zurückzugewinnen und mehrfach einzusetzen.

Methoden zur Enzymfixierung sind bereits mannigfach bekannt. Eine Übersicht über die neuesten Ergebnisse auf diesem Gebiet gibt z.B. J.C. Johnson (Herausgeber) in "Immobilized Enzymes, Preparation and Engineering"; Noyes Data Corp., Park Ridge, N.J., USA (1979).

Durch die Trägerfixierung der Enzyme können, neben den oben angegebenen, weitere Vorteile erreicht werden. Dies sind z.B.

- kontinuierliche Prozeßführung -
- erhöhte Stabilität -
- kleineres Reaktionsvolumen -
- keine Verunreinigung der Reaktionsansätze -
- keine Hitzefällung des Enzyms -

Zur Bindung eines Enzyms an eine unlösliche Trägersubstanz gibt es kein Standardverfahren. Das Ziel, die biologische Aktivität des Enzyms möglichst weitgehend zu erhalten, erfordert eine individuelle Anpassung von Trägersubstanz und Immobilisierungsmethode an das Enzym.

Besonders beliebte (da einfach zu verarbeitende und kostengünstige) Trägersubstanzen für diesen Zweck sind gelbildende Proteine wie Gelatine oder frisches Eiklar (s. hierzu beispielsweise die DE-AS 22 46 002). Diese Trägersubstanzen eignen sich jedoch nicht für die Fixierung von Enzymen mit proteolytischer Aktivität, da sie von ihnen hydrolysiert werden.

Es wurde daher bereits vorgeschlagen (s. DE-AS 26 36 206.1 -41), die gelbildenden Proteine durch chemische Härtung (z.B. mit Formaldehyd, Glutardialdehyd oder Diisocyanat)

zu denaturieren, um sie dadurch unangreifbar für die auf ihnen fixierten Proteasen zu machen. Auf diese Weise gelingt beispielsweise die Trägerfixierung des Labenzym oder auch von Pepsin (s. Biotechnology Letters 1 (1979) S. 225-230).

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Proteasen auch dann an gelbildende Proteine fixiert werden können, wenn man eine aufwendige chemische Vorbehandlung der Proteine unterläßt.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Immobilisierung von Proteasen an gelbildenden Proteinen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Protease mit einem gelbildenden Protein (z.B. Gelatine, Eiklar, Sojaprotein u.a., vorzugsweise Albumin) versetzt, das Gemisch mit einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel (Fällungsmittel) behandelt und anschließend die entstandene Teilchensuspension mit bi- und/oder polyfunktionellen Vernetzungsmitteln umsetzt. Gegenstand der Erfindung sind ferner die so erhaltenen trägerfixierten Enzympräparate und ihre Verwendung zum Abbau von Proteinen.

Das Gemisch aus dem proteolytischen Enzym und dem gelbildenden Protein kann durch Auflösen oder Suspendieren des Enzyms in einer wässrigen Lösung des gelbildenden Proteins hergestellt werden. Dabei wird die Temperatur vorzugsweise so eingestellt, daß das aktive Gemisch in flüssiger Form erhalten wird.

Das Gemisch aus proteolytischem Enzym und gelbildendem Protein wird vorzugsweise so hergestellt, daß man zunächst das proteolytische Enzym (z.B. Pepsin, Papain etc.) in Wasser löst und es dann mit einer wässrigen

Lösung des gelbildenden Proteins vermischt. Dieses Gemisch wird dann mit einem organischen Lösungsmittel, das enzymfällend wirkt und mit dem Enzym verträglich ist, versetzt. Beispiele dafür sind Aceton, Äthanol, Isopropanol oder Butanol. Die durch das Fällungsmittel entstandene Teilchensuspension wird derart und solange mit bifunktionellen oder polyfunktionellen Vernetzungsmitteln reagieren gelassen bis eine möglichst vollständige Vernetzung des Gemisches aus dem proteolytischen Enzym und dem gelbildenden Protein erreicht ist. Es ist auch möglich, das teilchenförmige Gemisch vorher von der organischen Flüssigkeit abzutrennen und erst dann mit dem Vernetzungsmittel zu behandeln.

Für die Vernetzungsreaktion kommen bifunktionelle und polyfunktionelle Vernetzungsmittel für Proteine in Frage. Vorzugsweise wird eine wässrige Lösung von Glutardialdehyd verwendet. Es ist auch möglich, das Kopplungsreagenz in einer der obengenannten enzymfällend wirkenden Flüssigkeiten zu lösen und in dieser Form dem wässrigen Gemisch aus proteolytischem Enzym und gelbildenden Protein zuzusetzen.

Dieses Reaktionsgemisch aus proteolytischem Enzym, gelbildendem Protein, enzymfällender Flüssigkeit und dem Vernetzungsmittel wird einige Zeit, vorzugsweise 0,5 - 4 Stunden kräftig gerührt. Die Kopplungsreaktion wird üblicherweise bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach Beendigung der Bindungsreaktion wird das Präparat mehrfach, vorzugsweise mit Wasser, gewaschen. Das so erhaltene Produkt kann dann auf den gewünschten Wassergehalt getrocknet werden (z.B. durch Sprühtrocknung oder Acetontrocknung).

Die nach der oben dargestellten Arbeitsweise hergestellten Enzymprodukte können in ansatzweise durchgeführten Verfahren zur Proteolyse von Eiweiß (Eiweißabbau) unter Abtrennung und erneuter Verwendung des Enzymproduktes oder in kontinuierlichen Verfahren in einem Enzymreaktor angewandt werden. Sie eignen sich besonders zur Behandlung proteinhaltiger Getränke (wie z.B. Wein, Bier und Fruchtsäfte), bei denen keine Enzyme im Endprodukt verbleiben sollen.

Bei dem verwendeten proteolytischen Enzym handelt es sich vorzugweise um Pepsin.

Die Bestimmung der Pepsin-Aktivität der löslichen sowie der immobilisierten Form, erfolgt nach der Methode von Anson

(Rick, W & Fritsch, W.-P. in Bergmeyer (Herausgeber): Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage., Band 1, S. 1086-1090, Verlag Chemie, Weinheim, 1974).

Die folgenden Beispiele dienen zur weiteren Erläuterung der Erfindung:

#### Beispiel 1

2 kg Pepsin wurden bei Zimmertemperatur in 10 l dest. Wasser gelöst. Diese Enzymlösung wurde mit einer wässrigen Albuminlösung (200 g Albumin in 5 l dest. Wasser) vermischt. Die so erhaltene Suspension wurde unter Rühren und bei einer Temperatur von 25°C in 24 l Isopropanol (80 %) gegeben und anschließend mit 1 l Glutardialdehyd (25 %) versetzt. Dieses Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 25°C gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Reaktionsprodukt abzentrifugiert und gründlich mit 200 l Wasser gewaschen. Das gewaschene Produkt wurde über einen Laborsprühtrockner mit Zwei-

stoffdüse bei einer Lufteingangstemperatur von 155°C, einer Luftausgangstemperatur von 75°C und einem Luftdurchsatz von 420 Nm<sup>3</sup>/h getrocknet. Das verwendete Pepsin (20 kg) hatte eine Gesamt-Ausgangsaktivität von 6000 AE (Anson-Einheiten). Das trägerfixierte Trockenpräparat betrug 415 g, und zeigte eine Gesamt-Aktivität von 3800 AE, was einer Wiedergewinnung nach der Immobilisierung und Sprühtrocknung von 63,3 % entspricht.

#### Beispiel 2

20 g Pepsin aus Schweinemagen (5 AE/g) wurden mit 2 g Ei-Albumin in 150 ml dest. Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 200 ml eiskaltes Aceton hinzugerührt. Nach einigen Minuten wurde zu dieser Suspension 10 ml 25%iger Glutardialdehyd-Lösung zugesetzt und bei Zimmertemperatur gerührt oder geschüttelt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 2 Stunden wurde das Reaktionsprodukt abfiltriert und gründlich mit dest. Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde in eiskaltem Aceton suspendiert. Durch Filtration wurde das immobilisierte Enzymprodukt vom Aceton getrennt, das Filtrat anschließend bei 45°C im Vakuum-Trockenschrank getrocknet. Es resultierten 2,5 g trägerfixiertes Trockenpräparat mit einer Aktivität von 11 AE/g.



Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von auf gelbildenden Proteinen trägerfixierten Proteasen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Proteasen mit einem gelbildenden Protein versetzt, das Gemisch mit einem enzymfällend wirkenden organischen Lösungsmittel behandelt und anschließend die entstandene Teilchensuspension mit einem oder mehreren Vernetzungsmitteln umsetzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als gelbildendes Protein Albumin einsetzt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Protease um Pepsin handelt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Vernetzungsmittel Glutardialdehyd eingesetzt wird.
5. Trägerfixiertes Proteasepräparat, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease kovalent mittels eines Vernetzungsmittels an ein nicht gehärtetes gelbildendes Protein gebunden ist.
6. Proteasepräparat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Pepsin kovalent mittels Glutardialdehyd an ein gelbildendes Protein gebunden ist.
7. Proteasepräparat nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das gelbildende Protein Albumin ist.

8. Verwendung eines Proteasepräparats nach einem der Ansprüche 5 bis 7 in biotechnologischen Verfahren.
9. Verwendung eines Proteasepräparats nach einem der Ansprüche 5 bis 7 zur Klärung von Getränken.
10. Verwendung eines Proteasepräparats nach Anspruch 7 zur Beseitigung des Eiweißtrübs in Wein oder Bier.

①9



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

①1

Veröffentlichungsnummer:

**0 080 077**  
**A3**

①2

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

②1

Anmeldenummer: 82110043.5

⑤1

Int. Cl.<sup>3</sup>: **C 12 N 11/02, C 12 H 1/00,**  
**A 23 L 2/34**

②2

Anmeldetag: 30.10.82

③0

Priorität: 19.11.81 DE 3145684

⑦1

Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM KG, ZA Patente,**  
**D-6507 Ingelheim am Rhein (DE)**

④3

Veröffentlichungstag der Anmeldung: 01.06.83  
Patentblatt 83/22

⑧4

Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU**  
**NL SE**

⑦2

Erfinder: **Bürger, Erich, Dr., Leipzigstrasse 7a,**  
**D-6530 Bingen (DE)**  
Erfinder: **Hartmeier, Winfried, Prof. Dr., Melatener**  
**Strasse 145a, D-5100 Aachen (DE)**

⑧8

Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 16.11.83 Patentblatt 83/46

⑤4

**Trägerfixierte Proteasen und ihre Anwendung in der Biotechnologie.**

⑤7

An ungehärteten gelbildenden Proteinen mittels kova-  
lenter Vernetzung fixierte Proteasen und ihre Anwendung  
zur Beseitigung der Eiweißtrübs in Getränken wie Wein,  
Bier oder Fruchtsäften.

**EP 0 080 077 A3**



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0080077

Nummer der Anmeldung

EP 82 11 0043

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 3)
X	DE-A-1 915 970 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE) * Insgesamt und besonders Beispiel 9 *	1, 2, 4- 8	C 12 N 11/02 C 12 H 1/00 A 23 L 2/34
A	US-A-3 597 219 (B.S. WILDI et al.) * Insgesamt * -----	8-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 3)
			C 12 N C 12 H
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 17-08-1983	Prüfer MARIE A.L.L.
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überein- stimmendes Dokument			